Aus der Chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts
der Universität München
Professor Dr. phil. et Dr. med. Amandus Hahn

Über den Abbau der Citronensäure

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen medizinischen Falkultät der Bayerischen
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karl Albert Mußhoff
Heiligenhaus, Rbz. Düsseldorf

Druck von W. Crüwell, Dortmund

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554006_0073

Die Citronensäure wurde im Jahre 1884 von *Scheele* entdeckt. Sie ist eine vieratomige, dreibasische, aliphatische Carbonsäure von der Konstitutionsformel CH_2 COOH — C(OH)COOH — CH_2 COOH. Sie stellt einen wichtigen organischen Bestandteil des tierischen und insbesondere des pflanzlichen Organismus dar.

Ich gehe kurz auf das Vorkommen im menschlichen Körper ein. *Skandinavische Forscher* [1—6] haben nachgewiesen, daß sie in allen humanen Körperflüssigkeiten, Sekreten und Exkreten vorkommt und daß ihr Gehalt unter physiologischen Bedingungen weitgehend konstant ist. *Scherstén* hat in seiner Arbeit über die Citronensäure diese Ergebnisse in einer Tabelle zusammengestellt, aus der hervorgeht, daß etwa Schweiß den geringen Wert von 1—2 Mikrogramm pro ccm, Blutserum 18—28, Liquor cerebrospinalis 45—50, Urin 200—1000 und Sperma den hohen Wert von 1800—4110 Mikrogramm pro ccm Citrat aufweisen.

Über die funktionelle Aufgabe der Citronensäure im Körper ist weniges bekannt; man nimmt an, daß sie mit Calzium eine schwach jonisierte Verbindung eingeht, wobei beide Körper einen gegenseitigen puffernden Einfluß aufeinander ausüben und bei der Überladung des Organismus durch Alkali das Säurebasengleichgewicht durch vermehrte Bildung und Ausscheidung von Alkalicitrat ausgleichen helfen. Der Citronensäuregehalt bleibt dabei, wie die skandinavischen Forscher nachgewiesen haben, unter physiologischen Verhältnissen konstant und verändert sich demgegenüber unter pathologischen Einflüssen in einer bestimmten und gesetzmäßigen Weise.

Ich weise hier als Beispiel auf die Hypocitricaemie bei drohender Thrombose hin, die Scherstén als ein Darniederliegen der Selbsthilfe des Körpers auffaßt; da die gerinnungsverhindernde Wirkung des Citrates fehlt, wird die Bildung von Abscheidungs- und Gerinnungsthromben gefördert. Man könnte sich vorstellen, daß bei rechtzeitiger intravenöser Injektion neutralisierter Citronensäure der Eintritt einer Thrombose in vielen Fällen vermieden werden könnte. Aus einer großen Zahl weiterer Untersuchungsergebnisse der skandinavischen Forscher geht hervor, daß eine Bestimmung des Citratgehaltes in vielen Krankheitsfällen einen bestimmten klinisch diagnostischen Wert besitzen kann. Es wäre daher an die Möglichkeit zu denken, daß die Feststellung des Citratgehaltes in den zu untersuchenden Körperflüssigkeiten und Exkreten, dem Blutserum, dem Liquor cerebrospinalis und dem Urin klinische

[1]) B. Benni, B. Scherstén u. O. Oestberg, Biochem. Z. **223,** 443 (1930).
[2]) B. Scherstén, Scand. Arch. f. Physiol. **63,** 97 (1932).
[3]) T. Thunberg, Biochem. Z. **3,** 17 (1933).
[4]) A. Lenner, Acta Obst. et Gyn. **14,** Suppl. 1 (1934).
[5]) O. Oestberg, Scand. Arch. f. Physiol. **62,** 81 (1931).
[6]) B. Benni, Biochem. Z. **221,** 270 (1930).

Anwendung finden könnte. Zu berücksichtigen ist einstweilen, daß die Untersuchungsmethoden in ihrer jetzigen Form noch nicht für die Klinik geeignet sind. Die Methode der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Citraten durch die spezifische Citricodehydrogenase des Gurkensamens, *Cucumis sativus*, und durch den Wasserstoffakzeptor und gleichzeitigen Indikator Methylenblau ist von *T. Thunberg*[7] angegeben worden.

Im folgenden soll unabhängig von allen praktisch klinischen Erwägungen untersucht werden, in welcher Weise sich der Abbau der Citronensäure in vitro abspielt.

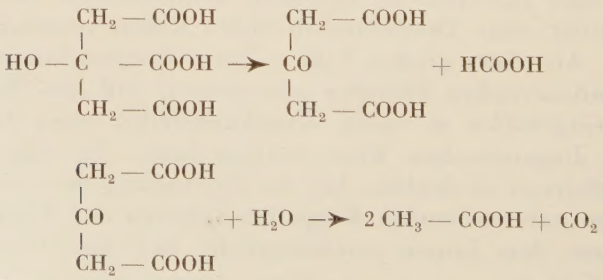
Hahn und *Haarmann* stellten auf Grund früherer Arbeiten an diesem Institut fest, daß im Muskel bei Zusatz von Citronensäure eine Vermehrung der Brenztraubensäure unter gleichzeitig gesteigerter Kohlensäurebildung stattfindet. Wir wenden uns, auf diesem Ergebnis aufbauend, der Frage über den chemisch-biologischen Abbau der Citronensäure durch Decarboxylierung zu und berücksichtigen im besonderen die Zwischenprodukte, die bei diesem Abbau entstehen.

Im Schrifttum findet sich darüber folgendes:

Thunberg[8] konnte zeigen, daß die Citronensäure die Größe der anoxybiotischen Kohlensäurebildung in der Froschmuskulatur wesentlich steigert.

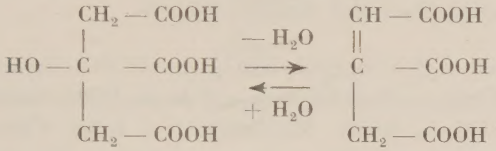
Hahn und *Haarmann*[9] fanden beim Abbau der Citronensäure im Rindermuskel eine vermehrte Bildung von Brenztraubensäure, und sie konnten das bei diesem Abbau notwendigerweise sich abspaltende Kohlendioxyd quantitativ feststellen. Es fand sich in gleicher Weise eine deutliche Vermehrung der CO_2-Bildung.

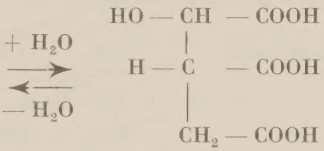
Wieland und *Sonderhoff*[10] stellten bei der aneroben Vergärung der Citronensäure durch verarmte Hefe als die beiden Hauptprodukte der enzymatischen Spaltungsreaktion Essigsäure und Kohlensäure fest. Die beim Abbau in geringen Mengen gefundene Ameisensäure führte die Verfasser zu der Annahme, daß als Zwischenprodukt die Acetondicarbonsäure entsteht, welche dann im weiteren Verlauf des Abbaus hydrolytisch in die Endprodukte $CO_2 + 2\ CH_3$-COOH gespalten wird:

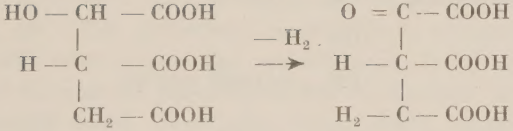


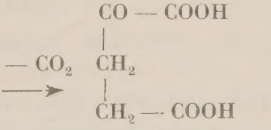
[7]) T. Thunberg, Abderhaldens Handb. biol. Arbeitsmeth., Abt. IV. Teil 2, 2017 (1933). Kungl. Fysiograf sällskap. i. Lund Förhandlingar **3**, 17 (1933); **4**, 18 (1934).
[8]) Thunberg: Skandinav. Archiv **24**, 72 (1911).
[9]) Hahn und Haarmann: Zeitschrift f. Biologie **89**, 332, Tab. 2.
[10]) H. Wieland und R. Sonderhoff, Liebigs Ann. **503**, 61 (1933) (1929).

Martius[11] brachte durch eine letzthin erschienene Arbeit eine ganz neue Richtung in die Erforschung des biologischen Abbaus der Citronensäure; es gelang ihm, mit einer aus Rindsleber hergestellten Dehydrase bei Zusatz von Methylenblau ein wohldefiniertes Abbauprodukt zu isolieren. Mit Dinitrophenylhydrazin konnte er in verhältnismäßig guter Ausbeute ein kristallisiertes Produkt erhalten, daß sich als Dinitrophenylhydrazon der α-Ketoglutarsäure erwies. Die Entstehung der α-Ketoglutarsäure erklärt Martius dadurch, daß aus Citronensäure zunächst unter Wasserabspaltung cis-Aconitsäure gebildet wird, welche dann unter Wasseranlagerung im umgekehrten Sinne in Isocitronensäure übergeht; diese liefert nun durch Dehydrierung und unter gleichzeitiger Abspaltung der sekundären Carboxylgruppe die erwähnte α-Ketoglutarsäure:









Diese Annahme von *Martius* erhält dadurch eine Stütze, daß er mit Hilfe desselben Enzympräparates umgekehrt die cis-Aconitsäure zu 65 % in Isocitronensäure umwandeln konnte. Schon früher haben *Malachowski* und *Maslowski*[12] darauf hingewiesen, daß die cis-Aconitsäure die Citronensäure in bezug auf Entfärbungsgeschwindigkeit im Thunbergversuch voll ersetzen kann. Und *Wagner-Jauregg*[13] gelang es, durch eine andere als der von Martius verwandten Dehydrase iso-Citronensäure rascher als Citronensäure zu dehydrieren. Beides sind gewichtige Stützen für Martius.

[11]) Martius, Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Ch. **247**, 104 (1937).

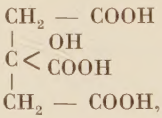
[12]) Malachowski, Maslowski: Ber. chem. Ges. **61**, 2524 (1928).

[13]) Wagner-Jauregg und H. Rauen, Hoppe-Seylers Z. f. physiol. Ch. **237**, 227 (1935)

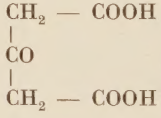
In der angeführten Literatur herrschen zwei Ansichten über den Chemismus des Citronensäureabbaues vor: Die eine Vorstellung sieht in der Acetondicarbonsäure das erste faßbare Zwischenprodukt und stützt sich auf den Nachweis von Acetondicarbonsäure und Aceton beim Citratabbau durch Pilze und Bakterien[14] sowie auf die gelungene Auffindung von Ameisensäure bei der anaeroben Vergärung durch verarmte Hefe. Die andere Ansicht denkt an die cis-Aconitsäure als die erste Stufe beim Abbau, und sie beruft sich auf die durchgeführte Umkehr dieses Prozesses und die einander entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Säuren.

Die vorliegende Arbeit berücksichtigt unter dem beherrschenden Gesichtspunkt der Decarboxylierung, auf deren Bedeutung Thunberg und Hahn hinweisen, beide Möglichkeiten beim Citronensäureabbau. Als Fermentträger dient der aus frischer Hefe hergestellte Digestionssaft nach *Lebedew*[15]. Es sind die

Citronensäure:

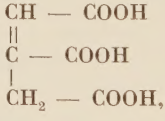


Acetondicarbonsäure:



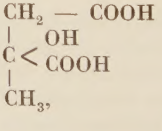
und die

cis-Aconitsäure:

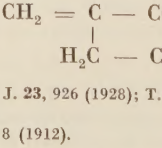


weiterhin die als Zwischenprodukte beim Citronensäureabbau durch Decarboxylierung möglicherweise entstehenden Säuren, die

Methyläpfelsäure:



Methylenbernsteinsäure:



[14]) Butterworth und Walker: Biochemic. J. **23**, 926 (1928); T. K. Walker, Subramaniam, Challenger, Chem. Soc. **200**, 3044 (1927).

[15]) A. Lebedew, Ann. Just. Pasteur **26**, 8 (1912).

Methylfumarsäure: $HOOC - CH$
$CH_3 - C - COOH$
$CH_2 - COOH$,

β-oxy-Glutarsäure: $HC - OH$
$CH_2 - COOH$ und die

β-oxy-Buttersäure: $CH_2 - COOH$
$C<^{H}_{OH}$
CH_3

auf die Höhe ihres anoxybiotischen Kohlensäureabbaues geprüft worden.

Die Wiedergabe der Versuche und deren Ergebnisse – den Chemismus des Citronensäureabbaues betreffend – werden im folgenden in der Reihenfolge aufgeführt werden, wie sie sich auf Grund der Resultate ergaben. Um den Gedankengang nicht auseinanderzureißen, wird die Methodik vom Hauptteil getrennt und anschließend gesondert behandelt werden. Zum Schluß folgt eine kurze Zusammenfassung und Auswertung der Ergebnisse.

Die Citronensäure spaltet unter der Einwirkung des Lebedewsaftes CO_2 ab. Die gebildete Kohlensäure entspricht bei einer Digestionszeit von 3 Stunden quantitativ 45 % einer Carboxylgruppe und kommt in langdauernden Versuchen der Menge einer Carboxylgruppe nahe, ohne aber diese Höhe, wenn man die aus dem Lebedewsaft allein abgespaltene CO_2-Menge abzieht, zu übersteigen. Diejenigen Säuren, welche aus der Citronensäure durch Abspaltung einer Carboxylgruppe entstehen können, sind anschließend auf ihre Fähigkeit, in gleicher Weise CO_2 zu bilden, untersucht worden. Dabei zeigt sich, daß von allen Säuren nur die Acetondicarbonsäure diese Fähigkeit besitzt. Die Größe der gewonnenen CO_2-Werte übersteigt die der Citronensäure unter gleichen Bedingungen fast um das Doppelte und es ist anzunehmen, daß bei genügend langer Digestionszeit mehr als eine Carboxylgruppe abgespalten wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit, d. h. in diesem Falle die Decarboxylierung der Acetondicarbonsäure, ist also in jedem Falle so groß wie die der Citronensäure. Es liegt die Vermutung nahe, daß aus der Citronensäure über die Acetondicarbonsäure das Aceton entsteht. Dieser Vorgang ist ein fließender und es ist darum die Abfangung der Acetondicarbonsäure als Zwischenprodukt schwierig. Die folgenden Versuche bezwecken aus diesem Grunde die sofortige Bestimmung des Acetons,

welches aus der Acetondicarbonsäure und aus der Citronensäure über die Acetondicarbonsäure entstehen sollte.

Es soll versucht werden, das Aceton als Jodoform durch die Jodtitration quantitativ und als p-Nitrophenylhydrazon nach *W. C. Graaf*[16] qualitativ nachzuweisen. Um die Genauigkeit der Methode nachzuprüfen, wurde in zwei gleichen Ansätzen Lebedewsaft mit Aceton digeriert und dieses als Jodoform und als p-Nitrophenylhydrazon bestimmt. Dabei wurden 92 % als Jodoform titrimetrisch und 91,3 % als p-Nitrophenylhydrazon gravimetrisch nachgewiesen. Letzteres zeichnete sich durch gute Kristallisation und genauen Schmelzpunkt aus. Die Methode genügt also den Anforderungen.

Die Acetondicarbonsäure ist nach 3 Stunden zu 37,2 % in Reaktion getreten, wie sich aus der gebildeten CO_2-Menge eines Parallelansatzes beweisen läßt. Von diesen im Abbau sich befindenden 37,2 % werden einerseits 73,4 % jodometrisch als Jodoform und anderseits 54 % als p-Nitrophenylhydrazon nachgewiesen. Das letztere zeigt charakteristische Kristallisation und eindeutigen Schmelzpunkt. Es ist damit als sicher anzusehen, daß die Acetondicarbonsäure im Lebedewsaft unter anoxybiotischen Verhältnissen Aceton und zwei Carboxylgruppen bildet.

Bei der Citronensäure ist das Ergebnis weniger befriedigend. Nach 4 Stunden sind 21,5 % oder 14,4 % in Reaktion begriffen, je nachdem, ob man die Abspaltung von 2 CO_2 + 1 HCOOH nach der Wielandschen Ansicht oder von 3 CO_2 annehmen will. Von diesen im Abbau sich befindenden 21,5 % bzw. 14,4 % der Citronensäure werden 32,6 % bzw. 48,8 % jodometrisch als Jodoform gefunden. Mit Nitrophenylhydrazin wird ein Produkt erhalten, welches zu 69 % der nach der CO_2-Abspaltung berechneten Acetonmenge entsprechen würde. Es erscheint aber außerordentlich zweifelhaft, daß es sich bei diesen Werten um Aceton handelt, da das zum qualitativen Nachweise bestimmte und mit p-Nitrophenylhydrazin erhaltene Produkt keine charakteristische Kristallisation und keinen eindeutigen Schmelzpunkt zeigt. Sicher ist nur, daß beim Abbau der Citronensäure im Lebedewsaft eine jodbindende Substanz entsteht. Da diese nicht als Aceton identifiziert werden kann, ist ihre Zusammensetzung vorerst unklar. Der Abbau der Citronensäure durch eine Decarboxylase über die Acetondicarbonsäure als Zwischenstufe ist damit unwahrscheinlich geworden.

Wir wenden uns der cis-Aconitsäure zu, die, wie wir gesehen haben, von *Martius* als die erste Phase des Citronensäureabbaues bezeichnet wird. Und wir finden in Analogie zu den *Malachowski-*

[16]) W. C. Graaf, C 1907, II, 101.

schen Versuchen über die Dehydrierung, daß die cis-Aconitsäure die Citronensäure auch in bezug auf die Decarboxylierungsgeschwindigkeit voll ersetzen kann. Sie bildet unter der Einwirkung der Decarboxylase des Lebedewsaftes die nahezu gleiche CO_2-Menge wie die Citronensäure. Die trans-Aconitsäure wirkt auf diesen Prozeß wie auf den der Dehydrierung, *Bernheim*[17], ausgesprochen hemmend. Diese Tatsachen weisen, gemeinsam mit den Ergebnissen von Martius, außerordentlich eindrucksvoll auf die Wahrscheinlichkeit hin, daß die cis-Aconitsäure eine Zwischenstufe beim Abbau der Citronensäure ist.

Bei der Untersuchung der Frage, ob beim Abbau der Citronensäure im Lebedewsaft flüchtige Säuren entstehen, können weder in den durch Eisenhydroxyd oder Aceton enteiweißten, noch in eiweißhaltigen und mit Wasserdampf destillierten Digestionen solche nachgewiesen werden. Wenn bei der Enteiweißung die Möglichkeit einer Fällung der Salze der flüchtigen Säuren oder einer Adsorption derselben an den Eiweißniederschlag besteht, so ist beides bei der technisch etwas schwierigen Destillation mit Wasserdampf auszuschließen. Die von *Wieland* und *Sonderhoff* in verarmter Hefe beschriebene Abspaltung von $^1/_4$ $^3/_4$ Mol. Ameisensäure konnte demnach beim Abbau der Citronensäure durch Lebedewsaft nicht beobachtet werden.

Die eingangs genannten Säuren, welche auf Grund ihrer chemischen Struktur beim Abbau der Citronensäure durch Decarboxylierung in Frage kommen, bewirken, außer der genannten, keine Vermehrung der CO_2-Abspaltung. Die cis-Aconitsäure, die Methyläpfel-, Methylfumar- und Methylenbernsteinsäure bilden aber neben der Citronen- und Acetondicarbonsäure (chemische Struktur siehe S. 8 und 9) ebenfalls einen jodbindenden Stoff, der aber in seiner Quantität so gering ist, daß er keinerlei Schlüsse zuläßt.

Der Faktor des Lebedewsaftes, der die CO_2-Abspaltung bewirkt, ist nicht einheitlicher Art: Es sind zwei wirksame Stoffe vorhanden, ein nicht kochbeständiger fermentativen Charakters und ein kochbeständiger vom Charakter eines Katalysators (*Wieland* und *Sonderhoff* denken, entgegen dieser Auffassung, nur an einen Katalysator.) Ihre Wirksamkeit auf die einzelnen Säuren ist verschieden. Das Ferment bewirkt eine Decarboxylierung der Citronen-, cis-Aconit- und Acetondicarbonsäure, der Katalysator nur eine solche der Acetondicarbonsäure. Das Ferment befindet sich nur im frischen Lebedewsaft, während der Katalysator auch noch in dem aus dem Lebedewsaft nach *Müller*[18] hergestellten Präparat vorhanden ist.

[17]) F. Bernheim: Biochemic. J. XXII. 2, 1178 (1928).
[18]) D. Müller: Bioch. Z. **262**, 239 (1933).

Methoden.

1. Bestimmung der CO_2 beim biologischen Abbau von Mono-, Bi- und Policarbonsäuren durch die Decarboxylase des Lebedewsaftes.

Die Hefepräparate sind aus Bierhefe der Löwenbräu-Brauerei zu München hergestellt worden. Die Hefe wird nach der von Lebedew[15] angegebenen Weise getrocknet und aus der Trockenhefe der nach ihm benannte Mazerationssaft bereitet.

Ein Ansatz enthält:

100 ccm Lebedewsaft,

1 g Carbonsäure in 50 ccm H_2O neutralisiert (beim Kontrollversuch 50 ccm m/15 Phosphatpuffer, $p_H = 7$),

15 Tropfen Toluol,

1—2 Tropfen Oktylalkohol.

Der Ansatz wird in eine Schüttelflasche gegeben, diese evakuiert und mit dem Inhalt über eine Zeitspanne von je 2—10 Stunden im Thermostaten bei 35° digeriert. Zur Hemmung der Bakterientätigkeit und ihrer Vermehrung wird den Ansätzen Toluol und zur Verhinderung des Schäumens des Flascheninhaltes beim Evakuieren Oktylalkohol zugesetzt. Beide Zusätze beeinflussen, wie Kontrollversuche beweisen, das Ergebnis nicht. Durch die Digestion unter Wasser wird das Vakuum selbst über eine längere Zeitdauer vollkommen erhalten. Nach der Digestion wird eine mit einer abgemessenen Menge $Ba(OH)_2$, 30—110 ccm, je nach der Zeitdauer der Digestion, beschickte und ebenfalls evakuierte Absorptionsflasche vorgelegt. In den Digestionsansatz wird unter Erhaltung des Vakuums 60 ccm einer 50%igen Schwefelsäure (1 l H_2O + 500 ccm konz. H_2SO_4) eingelassen. Sie setzt die bis dahin als Carbonat vorliegende Kohlensäure in Freiheit, die beim Öffnen des Verbindungshahnes überströmt. Die CO_2-Bildung ist beendet, sobald nach anfänglichem Nachlassen die Blasenbildung in der Flüssigkeit vollkommen stillsteht (ca. ¼ Stunde). Das nicht verbrauchte Bariumhydroxyd wird mittels einer n/10 Salzsäure zurücktitriert. Aus dem Verbrauch an n/10 $Ba(OH)_2$ wird die gebildete CO_2-Menge berechnet und in Prozenten auf eine Carboxylgruppe umgerechnet.

CO_2-Bildung aus 1 g Citronensäure durch Lebedewsaft im Vakuum bei 35°.

Digestionszeit	Gewöhnliche Ziffern: die in „mg" gebildete CO_2-Menge. *Kursivziffern:* die in Prozenten auf eine Carboxylgruppe berechnete CO_2-Menge.					
2 Stunden	72,6 *34,1 %*	61,8 *29,5 %*	85.9 *41.0 %*	76.8 *36.7 %*	73.8 *35,2 %*	79,6 *38,1 %*
desgl., abzüglich des O-Wertes* .	59,6 *28,5 %*		72.7 *34.6 %*			
3 Stunden.....	100,0 *47.7 %*	108.3 *52.1 %*	97.7 *46.5 %*	86.9 *41,5 %*	113,3 *54.0 %*	
desgl., abzüglich des O-Wertes* .	84,2 *40,0 %*	98.2 *46,7 %*	76,3 *36,3 %*	62,9 *30.1 %*	91,1 *43.4 %*	
3½ Stunden...	117,6 *56,1 %*	123,5 *59.0 %*				
desgl., abzüglich des O-Wertes* .	100,6 *48,0 %*	100.2 *47.7 %*				
4 Stunden.....	84,6 *40,5 %*	103.3 *49,4 %*	115,1 *55,0 %*	102.7 *49.0 %*		
desgl., abzüglich des O-Wertes* .		82.6 *39.4 %*				
5 Stunden.....	113,9 *54.4 %*					
6 Stunden.....	106,3 *50,8 %*	145,6 *69,5 %*	157,7 *75,1 %*			
8 Stunden.....	151,2 *72,2 %*	222,9 *106,5 %*				
10 Stunden....	193.8 *92.5 %*					

* O-Wert = die aus Lebedewsaft allein gebildete CO_2-Menge.

CO_2-Bildung aus Acetondicarbonsäure.

1. Durch Lebedewsaft

Digestionszeit	Verarbeitete Säuremenge			
2 Stunden	0,5 g und 1 g	84,8 *56,2 %*	169,9 *56,4 %*	200,0 *66,5 %*
3 Stunden	1 g	256,5 *85,0 %*	263,1 *87,5 %*	273,7 *91,0 %*
desgl., abzüglich des O-Wertes*.		235,1 *77,8 %*	239,1 *79,6 %*	251,5 % *83,6 %*
4 Stunden	0,5 g	122,1 *81,1 %*	251,6 *83,5 %*	255,2 *84,5 %*

2. Durch mit $Fe(OH)_3$ enteiweißtem Lebedewsaft

Digestionszeit	Verarbeitete Säuremenge	frisch	gekocht
3 Stunden	0,5 g	64,8 *43,0 %*	38,3 *25,4 %*
desgl., abzüglich des O-Wertes*		63,92 *42,4 %*	

3. Durch Müller-Ferment

Digestionszeit	Verarbeitete Säuremenge	frisch				gekocht
3 Stunden.....	0,24 g	45,3 *62,7 %*	43,4 *60,0 %*	34,32 *47,4 %*	34,8 *48,2 %*	37,0 *51,1 %*
desgl., abzüglich des O-Wertes*.				31,17 *43,2 %*		

* O-Wert = die aus Lebedewsaft allein gebildete CO_2-Menge.

CO_2-Bildung aus Brenztraubensäure durch Lebedewsaft.

Digestionszeit	Verarbeitete Säuremenge			
3 Stunden	0.5 g	98.5 *39.4 %*	128.5 *51.3 %*	102.5 *41.0 %*
desgl., abzüglich des O-Wertes*.		82.2 *32.8 %*	112.7 *45.0 %*	92.4 *36.9 %*

CO_2-Bildung aus Aconitsäure durch Lebedewsaft.

Digestionszeit	Verarbeitete Säuremenge		
3½ Stunden ..	½ g cis-A.	62 *49,2 %*	
desgl., abzüglich des O-Wertes*.		52,8 *41.8*	
	½ g trans-A.	1.98	

* O-Wert = die aus Lebedewsaft allein gebildete CO_2-Menge.

2. Nachweis des Acetons oder einer anderen jodbindenden Substanz beim Abbau von Carbonsäuren durch den Lebedewsaft.

a. Durch die Jodtitration.

Der Nachweis geschieht nach folgendem Reaktionsschema:

$$6\ NaOH + 3\ J_2 = 3\ NaOJ + 3\ NaJ + 3\ H_2O$$

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C = O \\ | \\ CH_3 \end{array} + 3\ NaOJ = \begin{array}{l} CJ_3 \\ | \\ C = O \\ | \\ CH_3 \end{array} + 3\ NaOH$$

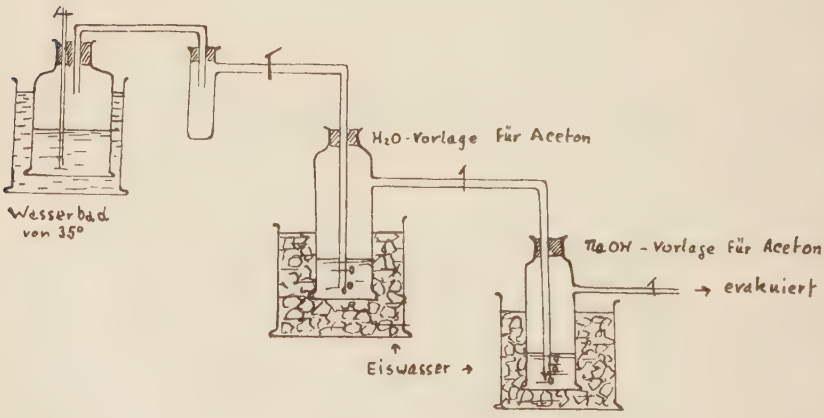
$$\begin{array}{l} CJ_3 \\ | \\ C - O \\ | \\ CH_3 \end{array} + NaOH \quad CHJ_3 + CH_3COONa$$

Die Kontrollversuche, kleine Mengen Aceton in einer Flüssigkeit nachzuweisen, ergeben nur dann ein einwandfreies Resultat, wenn die auf Aceton zu untersuchende Flüssigkeit zuerst nur mit der NaOH zusammengebracht und erst nach einer Wartezeit von einigen Minuten und gutem Durchschütteln die Jodlösung zugegeben wird.

In der angewandten Versuchsordnung wird der unter „Methodik 1" beschriebene Ansatz in gleicher Weise digeriert, anschließend ins Wasserbad von 35° gestellt und an eine mit NaOH beschickte eisgekühlte Vorlage angeschlossen. Nach Öffnen des Verbindungshahnes tritt infolge des Wärmegefälles ein kräftiges Durchperlen ein. In einer halben Stunde werden über 90 % der gebildeten Acetonmenge überführt und in der Natronlauge gelöst. Der Lösung wird 50 ccm n/10 Jodlösung zugefügt, das Ganze 30 Minuten stehengelassen, angesäuert und die Jodlösung mit Thiosulfat zurücktitriert.

b. Als p-Nitrophenylhydrazon nach *W. C. Graaf* [16].

Um nachzuweisen, daß es sich bei dem das Jodoform liefernden Stoff um Aceton handelt, wird dieses als p-Nitrophenylhydrazon qualitativ bestimmt. Die Ansätze mit Lebedewsaft und der Carbonsäure werden $2\frac{1}{2}$ Stunden im Vakuum bei 35° digeriert und dann unter Erhaltung des Vakuums bei gleicher Temperatur ½ Stunde lang überdestilliert. Die Versuchsanordnung unterscheidet sich dadurch von der vorigen, daß neben einer vorgeschalteten Waschflasche mit eisgekühltem Wasser zum Abfangen des Acetons eine solche mit NaOH angeschlossen wird. Die Lauge soll das bei der Digestion aus der Carbonsäure entstandene CO_2 absorbieren; denn es kommt nur dann ein richtiges Überströmen des acetonhaltigen Gasstromes zustande, wenn die gebildete Kohlensäure auf alle Fälle zur



Bindung gebracht wird. 400 mg p-Nitrophenylhydrazin werden in 10 ccm 30%iger Essigsäure gelöst und filtriert. Mit dem Filtrat wird das in H_2O gelöste Aceton quantitativ gefällt. Das erhaltene Produkt wird auf einem Glasfilter abgesaugt und gewogen. Zur eindeutigen Charakterisierung sind Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt festzustellen.

3. Bestimmung von flüchtigen Säuren beim Abbau der Citronensäure im eiweißhaltigen Lebedewsaft.

Die Bestimmung wird zu einem Teil in eiweißfreien und zum anderen in eiweißhaltigen Digestionen vorgenommen.

Die Citronensäure wird zuerst wie in allen Versuchen mit unverändertem Lebedewsaft im Thermostaten bei 35° geschüttelt. Der digerierte Ansatz wird dann zur Enteiweißung wie folgt behandelt:

Der Eiweißentzug geschieht durch Eisenhydroxyd oder Aceton. In einem Falle wird die doppelte Menge Eisenhydroxyd (Liquor Ferri oxydati duplex, 10 %. Merck) dem mit Wasser 10fach verdünnten eiweißhaltigen Mazerationssaft tropfenweise unter stetigem Rühren zugesetzt. Das ausfallende Eiweiß wird abfiltriert und das Filtrat nach Neutralisation auf die ursprüngliche Menge im Vakuum eingedampft. Im anderen Falle wird der Ansatz mit der 3–4fachen Menge Aceton versetzt, wodurch das Eiweiß langsam ausflockt. Nach einstündigem Stehen wird das Ganze filtriert, das Filtart neutralisiert und das Aceton im Vakuum verdampft. In den nun eiweißfreien Flüssigkeiten werden die durch die Neutralisation gebundenen flüchtigen Säuren durch Schwefelsäure wieder in Freiheit gesetzt und im Liebigkühler überdestilliert. Das Filtrat wird mit einer n/10-Lauge gegen Nitrophenol titriert.

Die Bestimmung der flüchtigen Säuren ohne vorherigen Eiweißentzug geschieht in der Weise, daß der ganze Ansatz nach der Digestion in einen geräumigen Kolben getan und nach schwacher Ansäuerung mit Wasserdampf destilliert wird. Um das Schäumen des Kolbeninhaltes zu verhindern, ist es zweckmäßig, dem Ansatz einige Tropfen Oktylalkohol zuzusetzen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Arbeit beschäftigt sich mit der CO_2-Abspaltung aus der Citronensäure und einiger beim Citronensäureabbau in Frage kommenden Carbonsäuren unter der Einwirkung des Lebedewsaftes. Die dabei entstehenden Produkte sind auf ihre chemische Struktur untersucht worden.

Es wird festgestellt, daß die Citronensäure und von den Säuren, die als mögliche Zwischenprodukte bei ihrem Abbau erscheinen, die cis-Aconitsäure und die Acetondicarbonsäure Kohlensäure bilden. Die Citronen- und cis-Aconitsäure ergeben bei diesem Abbau übereinstimmende CO_2-Werte: sie spalten beide je eine Carboxylgruppe ab. Von diesen beiden Säuren unterscheidet sich die Acetondicarbonsäure durch die Abspaltung von zwei Carboxylgruppen und durch die Verschiedenheit der Faktoren, welche die Loslösung der CO_2-Gruppen vom Stamm verursachen: während die Decarboxylierung der Citronen- und cis-Aconitsäure nur durch ein Ferment bewirkt wird, ist beim Abbau der Acetondicarbonsäure neben diesem auch noch ein Katalysator maßgebend beteiligt. Dieser Katalysator befindet sich auch noch in dem aus dem Lebedewsaft nach Müller hergestellten Präparat. Er bewirkt keine nennenswerte Vermehrung der CO_2-Abspaltung bei der Citronen- und cis-Aconitsäure. *Es führen bei der Citronen- und cis-Aconitsäure dieselben Ursachen unter gleichen chemischen und physikalischen Bedingungen zum gleichen Ergebnis: Abspaltung von CO_2 mit gleicher Reaktionsgeschwindigkeit durch die Decarboxylase des Lebedewsaftes. Dadurch erhält die Annahme, daß die cis-Aconitsäure eine Zwischenstufe beim Abbau der Citronensäure sei, außer den von Malachowski, Maslowski und Martius gelieferten Beweisen eine weitere Stütze.*

Die Auffindung der α-Ketoglutarsäure als Abbauprodukt der Citronensäure ist insofern von Wichtigkeit, als nach *F. Knoop* und *Embden* in der Ketoglutarsäure die Grundsubstanz wichtiger Aminosäuren gesehen werden kann, der Glutamin- und Oxyglutaminsäure und vielleicht auch des Histidins. Damit wird der Citronensäure eine wichtige Rolle als Zwischenprodukt der Eiweißsynthese im Organismus zugewiesen.

Die Entstehung flüchtiger Säuren beim Citronensäureabbau konnte in mehreren unterschiedlichen Versuchsanordnungen nicht nachgewiesen und damit die von Wieland und Sonderhoff in verarmter Hefe beschriebene Abspaltung von $^1/_4$—$^1/_3$ Mol Ameisensäure im Lebedewsaft nicht beobachtet werden.

Wir folgern daraus, daß aus der Citronensäure im Lebedewsaft weder durch Abspaltung einer Carboxylgruppe noch durch Bildung einer flüchtigen Säure die Acetondicarbonsäure entsteht, und wir kommen zu der Auffassung, *daß die Acetondicarbonsäure kein Zwischenprodukt beim biologischen Abbau der Citronensäure durch den Lebedewsaft ist*, eine Annahme, die von *Martius* vertreten und durch die Versuche von *Wagner-Jauregg* und *H. Rauen* unterstrichen wird. *Wagner-Jauregg* und *H. Rauen* fanden, daß die Acetondicarbonsäure und die Ameisensäure als Wasserstoffdonatoren die Citronensäure nicht ersetzen können.

Beim direkten Abbau der Acetondicarbonsäure entsteht durch fermentative und katalysatorische Abspaltung der beiden Carboxylgruppen das Aceton, welches als p-Nitrophenylhydrazon eindeutig festgelegt wird.

Die Citronen-, Acetondicarbon-, cis-Aconit-, Methyläpfel-, Methylfumar- und die Methylenbernsteinsäure bilden durch CO_2-Abspaltung eine jodbindende Substanz, welche beim Abbau der Acetondicarbonsäure das Aceton darstellt.

Ich danke Herrn Professor Dr. phil. et Dr. med. Amandus Hahn für die gütige Überlassung des Themas und für das rege Interesse, das er stets meiner Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Dr. Ottava danke ich für die freundliche Einführung in die Arbeitsmethoden.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München